

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Mai 2001 (03.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/31040 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/75.
15/79, 1/21. C12P 21/00

(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9,
81679 München (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10593

(81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, US.

(22) Internationales Anmeldedatum:
27. Oktober 2000 (27.10.2000)

(84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

Veröffentlicht:

— Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu
veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

(30) Angaben zur Priorität:
199 51 765.7 27. Oktober 1999 (27.10.1999) DE

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.

(71) Anmelder und

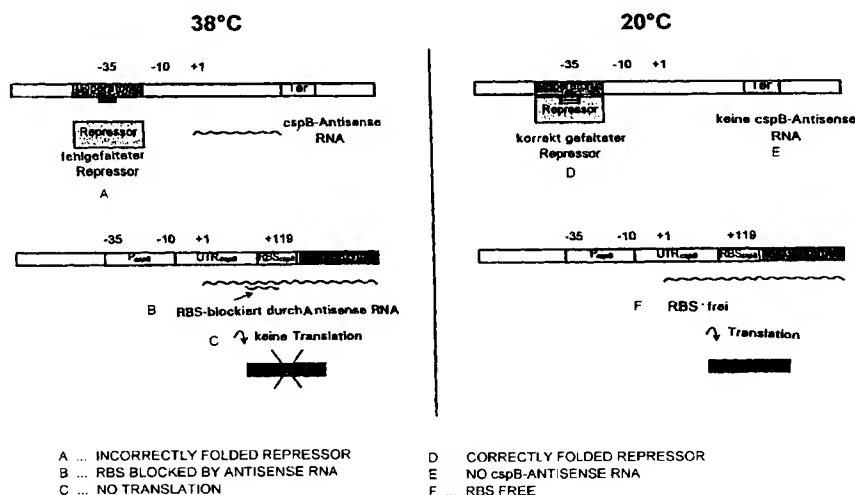
(72) Erfinder: SCHWEDER, Thomas [DE/DE]; Steinstrasse
13/14, 17489 Greifswald (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KANN, Tanja
[DE/DE]; Lange Reihe 27A, 17489 Greifswald (DE).

(54) Title: HOST-VECTOR SYSTEMS IN ORDER TO OVER-PRODUCE THERMOLABILE ENZYMES ORIGINATING
FROM PSYCHROPHILIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: WIRTS-VEKTOR-SYSTEME ZUR ÜBERPRODUKTION VON THERMOLABILEN ENZYMEN
PSYCHROPHILER ORGANISMEN



(57) Abstract: The invention relates to a system for temperature-regulated gene expression, in particular for the over-expression of cold-adapted, thermolabile proteins originating from psychrophilic organisms.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Systeme zur temperaturregulierten Genexpression, insbesondere zur Überexpression von kälteangepassten, thermolabilen Proteinen aus psychrophilen Organismen.

WO 01/31040 A2

Wirts-Vektor-Systeme zur Überproduktion von thermolabilen Enzymen psychrophiler Organismen

5

Beschreibung

Die Erfindung betrifft Systeme zur temperaturregulierten Genexpression, insbesondere zur Überexpression von kälteangepaßten, thermolabilen Proteinen aus psychrophilen Organismen.

10

Kälteangepaßte, sogenannte psychrophile Organismen können noch bei extrem niedrigen Temperaturen wachsen. Diese Organismen findet man unter anderem im arktischen bzw. antarktischen Eis und Meerwasser sowie in der Tiefsee. Enzyme dieser Organismen zeichnen sich durch eine hohe katalytische Aktivität bei sehr niedrigen Temperaturen, z.B. 4°C aus. Diese Eigenschaft wird durch eine im Vergleich zu Enzymen von wärmeliebenden Organismen flexiblere Proteinstruktur realisiert. Diese größere Thermoflexibilität hat zur Folge, dass übliche großtechnische Produktionsverfahren, die bei 37°C arbeiten, zum Entstehen von partiell denaturierten Produkten führen, die als sogenannte Einschlußkörper in den Zellen akkumuliert werden können, und - sofern überhaupt - nur mit geringer Ausbeute renaturiert werden können.

Feller et al. (Appl. Environ. Mikrobiol. 64 (1998), 1163-1165) beschreiben die Überexpression einer kälteangepaßten Amylase aus einem antarktischen Bakterium in dem mesophilen Expressionswirt *Escherichia coli*. Nach Expression bei 37°C konnte keine Amylaseaktivität gemessen werden. Es wurde daher vorgeschlagen, nach erfolgter Überexpression bei 18°C oder 25°C die Fermenterkultur über Nacht bei 4°C zu inkubieren. Durch diese lange Temperaturerniedrigung konnte wenigstens die Renaturierung eines Teils der überproduzierten Amylase erreicht werden. Dabei kann jedoch ein proteolytischer Abbau der rekombinanten Kälteproteine durch zelleigene

30

- 2 -

Proteasen während der langen Inkubationsdauer erfolgen. Außerdem ist das Verfahren für eine Produktion im großtechnischen Maßstab ungeeignet.

WO96/03521 beschreibt ein kälteinduzierbares Expressionssystem für den
5 Gram-negativen mesophilen Wirt *Escherichia coli*. Dieses System basiert auf den regulatorischen Sequenzen des Hauptkälteschockproteins von *E.coli*, CspA. Weiterhin wird ein kälteinduzierbares Expressionssystem beschrieben, bei dem ein mutierter Promotor des *E.coli*-Phagen λ (pL) verwendet wird. Dieser Promotor wird durch niedrige Temperaturen von weniger als 20°C
10 aktiv und erlaubt somit eine selektive Expression rekombinanter Proteine unter diesen Bedingungen. Die beschriebenen Expressionssysteme sollen eine korrekte Faltung rekombinanter Proteine bei Temperaturen unter 20°C ermöglichen. Ein Nachteil dieses Verfahrens ist die Beschränkung auf das Gram-negative Bakterium *E.coli*, welches bei geringen Temperaturen nur ein
15 sehr schlechtes Wachstum zeigt.

Das wirtschaftliche Potential von kälteangepaßten Proteinen, z.B. Enzymen, ist sehr hoch einzuschätzen. Vor allem in der Lebensmittelverarbeitung und in der molekularbiologischen Diagnostik finden diese Proteine ein weites
20 Anwendungsspektrum, welches bisher jedoch aufgrund der hohen Produktionskosten begrenzt war. Es besteht daher ein Bedürfnis, Systeme und Verfahren zu entwickeln, die eine kostenkünstige und großtechnische Produktion thermolabiler Proteine ermöglichen.

25 Diese Aufgabe wird durch die Bereitstellung eines neuen temperaturregulierbaren Expressionssystems gelöst, welches vorzugsweise auf einer Expressionskontrollsequenz eines für ein Kälteschockprotein kodierenden Gens, insbesondere des *cspB*-Gens aus *B.subtilis* basiert und dessen Regulation durch einen Antisense-RNA-Mechanismus erfolgt. Das
30 System ermöglicht eine kälteinduzierbare Überexpression in einer Vielzahl von Organismen, z.B. eukaryontischen Zellen wie Hefen, z.B. *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* u.a. und Pilzen z.B. *Aspergillus*

- 3 -

niger u.a., oder prokaryontischen Zellen, z.B. *Escherichia coli*, *Lactobacillus lactis*, *Staphylococcus carnosus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus brevis* u.a., insbesondere in Gram-positiven Bakterien, z.B. in *Bacillus subtilis*, aber auch in Gram-negativen Bakterien. Das System basiert vorzugsweise auf einem Promotor, der bei geringen Temperaturen aktiv, jedoch nicht kälteinduzierbar ist. Aber auch kälteinduzierbare Promotoren können eingesetzt werden. Die Verwendung des Gram-positiven Mikroorganismus *B. subtilis* als Expressionswirt ist weiterhin bevorzugt, da dieser besser an Temperaturen von 20°C angepaßt ist als *E.coli*, und im Vergleich zu *E.coli* besser zur Sekretion rekombinanter Proteine ins extrazelluläre Medium befähigt ist. Aufgrund dieser Charakteristika wird durch das erfindungsgemäße Expressionssystem ein effektiverer Fermentationsprozeß bei niedrigen Temperaturen und eine effizientere und weniger kostspieligere Reinigung der gewünschten Proteine nach Überexpression ermöglicht.

15

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein System zu temperaturregulierten Genexpression umfassend

- (a) eine Genexpressionseinheit enthaltend eine erste Expressionskontrollsequenz mit einem Promotor und einer ribosomalen Bindungsstelle, und
- (b) eine Regulationseinheit enthaltend eine Nukleinsäure, die bei Transkription eine zur ersten Expressionskontrollsequenz komplementäre Antisense-RNA ergibt, in operativer Verknüpfung mit einer temperaturregulierbaren zweiten Expressionskontrollsequenz.

25

Die zweite Expressionskontrollsequenz ist vorzugsweise kälteregulierbar, d.h. bei einer hohen Temperatur von z.B. 37°C wird die Transkription von Antisense-RNA vermittelt durch die zweite Expressionskontrollsequenz erlaubt, wodurch bewirkt wird, dass die Translation eines durch die erste Expressionskontrollsequenz erzeugten Transkripts aufgrund einer Bindung der Antisense-RNA an das Transkript zumindest teilweise reprimiert ist. Auf diese Weise wird ein Fermentationsprozeß ermöglicht, bei dem in einer

30

- 4 -

ersten Phase, der sogenannten Wachstumsphase bei höheren Temperaturen, ein schnelles Wachstum der Wirtszellen erfolgt, während bei diesen Bedingungen keine oder nur sehr schwache Expression des gewünschten Proteins stattfindet. Sobald eine genügend hohe Zelldichte

5 erreicht ist, kann dann die zweite Phase der Fermentation, die sogenannte Produktionsphase beginnen. In dieser Phase wird das Expressionssystem durch Temperaturverringerung induziert und das rekombinante Protein überproduziert.

10 Die durch Antisense-RNA vermittelte Temperaturregulierung kann grundsätzlich durch zwei verschiedene Ausführungsformen realisiert werden. In einer ersten Ausführungsform erfolgt eine Transkription der Antisense-RNA nur bei hohen Temperaturen von z.B. $\geq 37^{\circ}\text{C}$. Eine Bindung dieser Antisense-RNA an die durch die erste Expressionskontrollsequenz

15 erzeugte mRNA stromaufwärts oder/und stromabwärts im Bereich der Ribosomenbindungsstelle verhindert eine Initiation der Translation des Fremdproteins. Die temperaturregulierte Transkription der Antisense-RNA kann durch Verwendung temperatursensitiver Repressoren erfolgen, z.B. des temperatursensitiven Repressors CI587 des E.coli Phagen λ , der nur bei

20 Temperaturen unterhalb 37°C korrekt gefaltet und damit aktiv ist. Dies hat zur Folge, dass bei einer Temperaturerniedrigung auf 20°C der Repressor an seine Operatorregion bindet und damit eine Transkription der Antisense-DNA vermittelt durch die zweite Expressionskontrollsequenz verhindert. Damit wird keine neue Antisense-RNA bei dieser Temperatur gebildet. Neu

25 von der ersten Expressionkontrollsequenz erzeugte mRNA-Moleküle sind nicht mehr blockiert und können sich an die Ribosomen anlagern, eine Translation der Fremdproteine wird gestartet.

In einer zweiten Ausführungsform der Erfindung wird eine Antisense-RNA

30 derart konstruiert, dass sie bei einer Temperaturerniedrigung auf 20°C eine Sekundärstruktur ausbildet, so dass sie sich nicht mehr an die Ziel-mRNA anlagern kann. Mit Hilfe von entsprechenden Computerprogrammen können

- 5 -

entsprechende mRNA-Sekundärstrukturen vorausberechnet werden. So können ausgehend von einer gegebenen Sequenz durch schrittweise Veränderung entsprechende Antisense-RNA-Moleküle erzeugt werden, die bei 20°C eine stabile Sekundärstruktur aufweisen, die nicht mehr an die Ziel-mRNA bindet. In dieser Ausführungsform wird die Expression der Antisense-RNA durch einen vorzugsweise schwachen konstitutiven Promotor oder durch einen durch Temperaturverringerung auf 20°C abschaltbaren Promotor realisiert.

Die Antisense-RNA weist vorzugsweise eine Länge bis zu 200 Nukleotiden auf, es sind jedoch auch kürzere Antisense-RNA Moleküle möglich. Vorzugsweise beträgt die Länge des komplementären Sequenzabschnitts der Antisense-RNA Moleküle 20 bis 100 Nukleotide. Die Sequenz der Antisense-DNA wird so gewählt, dass die davon durch Transkription erzeugten RNA-Moleküle mindestens teilweise die ribosomale Bindestelle der von der ersten Expressionseinheit transkribierten mRNA blockieren.

Die Genexpressionseinheit des erfindungsgemäßen Systems enthält eine erste Expressionskontrollsequenz, die vorzugsweise zur Expression thermolabiler Proteine geeignet ist, d.h. bei Temperaturen von $\leq 20^{\circ}\text{C}$ eine effiziente Transkription und Translation ermöglicht. Die erste Expressionskontrollsequenz umfaßt daher günstigerweise den Promotor oder/und die ribosomale Bindungsstelle eines Kälteschockgens, beispielsweise das cspB-Gens von B.subtilis.

Zusätzlich kann die erste Expressionskontrollsequenz stromabwärts der ribosomalen Bindungsstelle eine translatierbare Nukleotidsequenz, insbesondere eine effizient bei niedrigen Temperaturen translatierbare Nukleotidsequenz enthalten, die zur Verbesserung der Translationseffizienz der gewünschten Proteine dient. Diese translatierbare Nukleotidsequenz kann z.B. für den N-Terminus von Kälteschockproteinen kodieren, z.B. für die ersten 10 bis 20 Aminosäuren von CspB. Am Ende der translatierbaren

- 6 -

Nukleotidsequenz können ein oder mehrere, z.B. zwei Stopcodons lokalisiert sein, so dass die Translation in Form eines Cistrons mit zwei separaten kodierenden Bereichen (translationsverbesserndes Peptid bzw. Polypeptid und gewünschtes rekombinantes Protein) erfolgt. Alternativ kann das
5 gewünschtes rekombinante Protein auch als Fusionsprotein mit dem translationsverbessernden Peptid bzw. Polypeptid exprimiert werden, wobei in diesem Fall eine Spaltstelle, z.B. eine proteolytische Spaltstelle zwischen den beiden genannten Domänen des Fusionsproteins eingebaut werden kann.

10

Die Genexpressionseinheit kann weiterhin eine Klonierungsstelle in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthalten, um die Einklonierung eines gewünschten Zielgens zu ermöglichen. In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann die Genexpressionseinheit
15 bereits ein Strukturgen, welches vorzugsweise für ein thermolabiles Protein kodiert, in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthalten.

20

Das erfindungsgemäße Genexpressionssystem kann auf einem oder zwei Vektoren oder auch auf dem Chromosom einer Wirtszelle lokalisiert sein. Die Vektoren sind vorzugsweise prokaryontische Vektoren, d.h. Vektoren, die zur Propagierung in einer prokaryontischen Wirtszelle fähig sind. Beispiele für derartige Vektoren sind Plasmidvektoren, Bakteriophagen, Cosmide, etc. Bevorzugt werden Vektoren verwendet, die für eine Propagierung in Gram-
25 positiven prokaryontischen Wirtszellen, insbesondere B.subtilis, geeignet sind. Die Vektoren weisen einen für die jeweilige Wirtszelle geeigneten Replikationsursprung sowie vorzugsweise ein Antibiotikumresistenzgen auf, um eine Selektion zu ermöglichen.

30

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Zelle, die ein erfindungsgemäßes Expressionssystem enthält. Vorzugsweise ist die Zelle eine eukaryontische Zelle oder eine Gram-positive Zelle, insbesondere eine B.subtilis Zelle.

- 7 -

Das erfindungsgemäße Expressionssystem und die erfindungsgemäße Zelle können in einem Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden, insbesondere von thermolabilen Polypeptiden in Prokaryonten verwendet werden.

5

Die Erfindung betrifft somit auch ein Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in einer prokaryontischen Zelle, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass man

- (i) eine Zelle bereitstellt, die ein erfindungsgemäßes Expressionssystem
10 enthält,
- (ii) die Zelle aus (i) in einem geeigneten Medium und unter geeigneten Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression des gewünschten Polypeptids führen, und
- (iii) das Polypeptid aus der Zelle oder aus dem Medium isoliert.

15

Die Kultivierung der Zelle in Schritt (ii) des erfindungsgemäßen Verfahrens wird vorzugsweise auf solche Weise durchgeführt, dass bis zum Erreichen einer vorbestimmten Zelldichte die Expression des für das gewünschte Polypeptid kodierenden Gens weitgehend reprimiert ist, d.h. unter
20 Bedingungen, bei denen die Translation der durch die erste Expressionskontrollsequenz transkribierten mRNA durch die von der zweiten Expressionskontrollsequenz transkribierten Antisense-RNA zumindest weitgehend unterdrückt wird. Nach Erreichen einer vorbestimmten Zelldichte wird durch Temperaturänderung, insbesondere Temperaturverringerung auf
25 Temperaturen von $\leq 20^{\circ}\text{C}$, die Expression des gewünschten Polypeptids induziert.

30

- 8 -

Die Erfindung wird weiterhin durch nachfolgende Figuren erläutert. Es zeigen:

- 5 Figur 1 die regulatorische Sequenz des Kälte-Schockgens cspB von B.subtilis bis zum Startcodon ATG,
- 10 Figur 2 die regulatorische Sequenz des Kälte-Schockgens cspB von B.subtilis bis zum 16. Codon der kodierenden Sequenz, einem anschließenden Stopcodon TAA und einem zweiten Startcodon (für eine Expression als Cistron mit zwei kodierenden Bereichen),
- 15 Figur 3A ein Beispiel für eine Antisense-RNA zu cspB von B.subtilis,
- 20 Figur 3B eine schematische Darstellung der Regulation der Synthese dieser Antisense-RNA; das Gen für den thermolabilen Repressor, z.B. cl857 kann entweder auf einem Plasmid vorliegen oder im Chromosom integriert sein,
- 25 Figur 4 die schematische Darstellung einer ersten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Expressionssystems (Regulation der Antisense-RNA über einen temperatursensitiven Repressor) und
- 30 Figur 5 Beispiele für Antisense-RNA Moleküle mit temperaturlabilen Sekundärstrukturen, die für eine zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet sind.

Ansprüche

1. System zur temperaturregulierten Genexpression umfassend
 - 5 (a) eine Genexpressionseinheit enthaltend eine erste Expressionskontrollsequenz mit einem Promotor und einer ribosomalen Bindungsstelle,
 - (b) eine Regulationseinheit enthaltend eine Nukleinsäure, die bei Transkription eine zur ersten Expressionskontrollsequenz
10 komplementäre Antisense-RNA ergibt; in operativer Verknüpfung mit einer temperaturregulierbaren zweiten Expressionskontrollsequenz.
2. System nach Anspruch 1,
15 **dadurch gekennzeichnet,**
dass die zweite Expressionskontrollsequenz so gewählt ist, dass bei einer hohen Temperatur die Transkription von Antisense-RNA vermittelt durch die zweite Expressionskontrollsequenz erfolgt und die Translation vermittelt durch die erste Expressionskontrollsequenz
20 zumindest teilweise reprimiert ist.
3. System nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste Expressionskontrollsequenz zur Expression
25 thermolabiler Proteine geeignet ist.
4. System nach Anspruch 3,
dadurch gekennzeichnet,
dass die erste Expressionskontrollsequenz den Promotor oder/und die
30 ribosomale Bindungsstelle eines Kälteschockgens umfaßt.

- 10 -

5. System nach Anspruch 4,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Kälteschockgen das cspB Gen von B.subtilis ist.
- 5 6. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass stromabwärts der ribosomalen Bindungsstelle der ersten
Expressionskontrollsequenz noch eine effizient translatierbare
Nukleotidsequenz angeordnet ist.
- 10 7. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Genexpressionseinheit (a) weiterhin eine Klonierungsstelle
in operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz
15 enthält.
8. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Genexpressionseinheit (a) weiterhin ein Strukturgen in
20 operativer Verknüpfung mit der Expressionskontrollsequenz enthält.
9. System nach Anspruch 8,
dadurch gekennzeichnet,
dass das Strukturgen für ein thermolabiles Protein kodiert.
- 25 10. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
dass die Transkription der Antisense-RNA durch einen
temperatursensitiven Repressor reguliert ist.
- 30 11. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,

- 11 -

dass die Antisense-RNA eine thermolabile Sekundärstruktur aufweist.

12. System nach einem der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
5 dass die Antisense-RNA eine Länge bis zu 200 nt aufweist.
13. Zelle enthaltend ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 12.
- 10 14. Zelle nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie eine eukaryontische Zelle ist.
- 15 15. Zelle nach Anspruch 13,
dadurch gekennzeichnet,
dass sie eine Gram-positive Zelle, insbesondere eine B.subtilis Zelle ist.
- 20 16. Verfahren zur gentechnischen Herstellung von Polypeptiden in einer prokaryontischen Zelle,
dadurch gekennzeichnet,
dass man
- (i) eine Zelle bereitstellt, die ein Expressionssystem nach einem der Ansprüche 1 bis 12 enthält,
- 25 (ii) die Zelle aus (i) in einem geeigneten Medium und unter geeigneten Bedingungen kultiviert, die zu einer Expression des gewünschten Polypeptids führen, und
- (iii) das Polypeptid aus der Zelle oder aus dem Medium isoliert.
- 30 17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,

- 12 -

dass die Bedingungen in Schritt (ii), die zu einer Expression des Polypeptids führen, eine Kultivierung bei $\leq 20^{\circ}\text{C}$ umfassen.

18. Verfahren nach Anspruch 16 oder 17,
5 **dadurch gekennzeichnet,**
dass ein Polypeptid aus einem psychrophilen Organismus hergestellt wird.

Abbildung 1

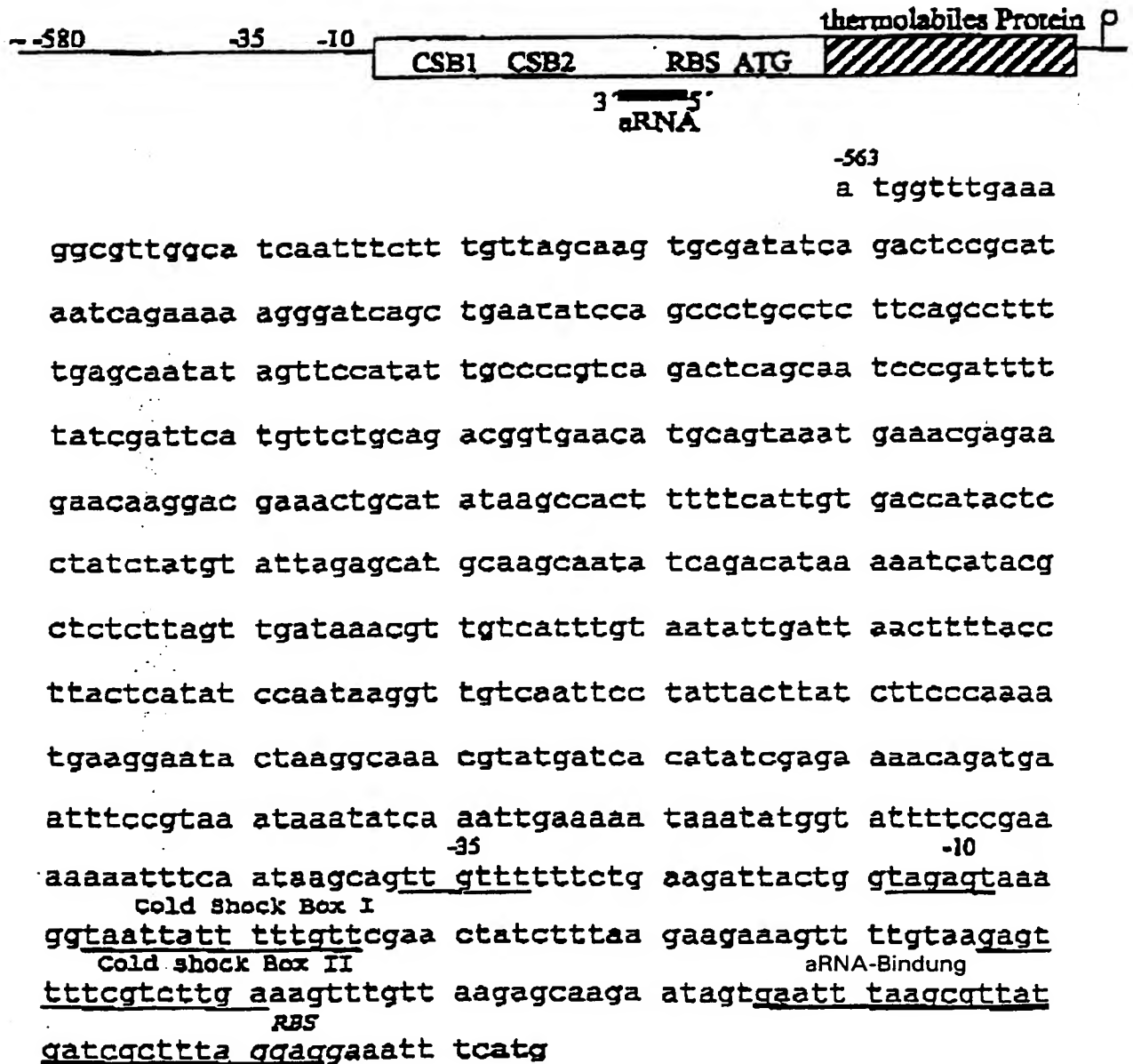


Abbildung 1

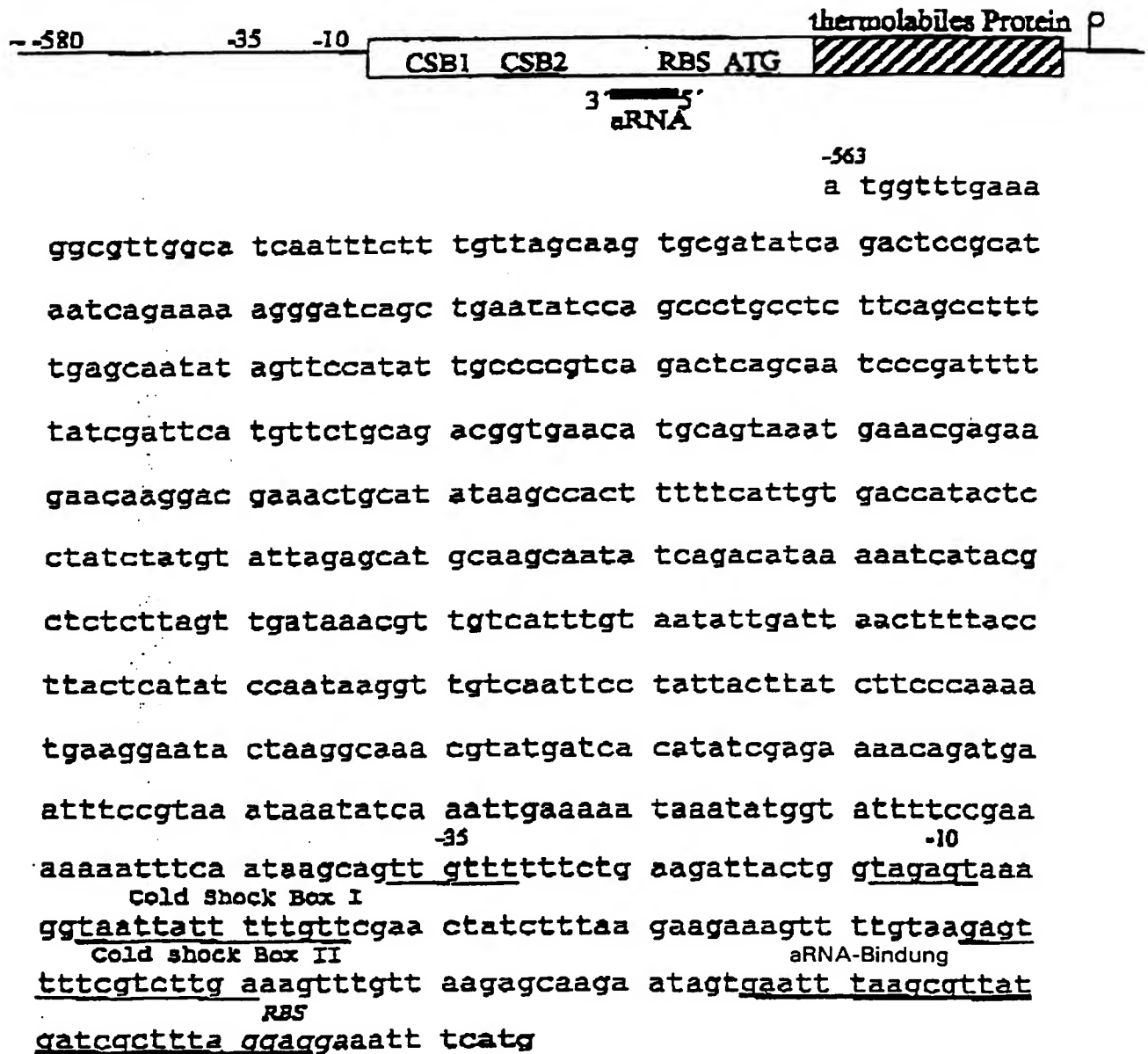


Abbildung 2

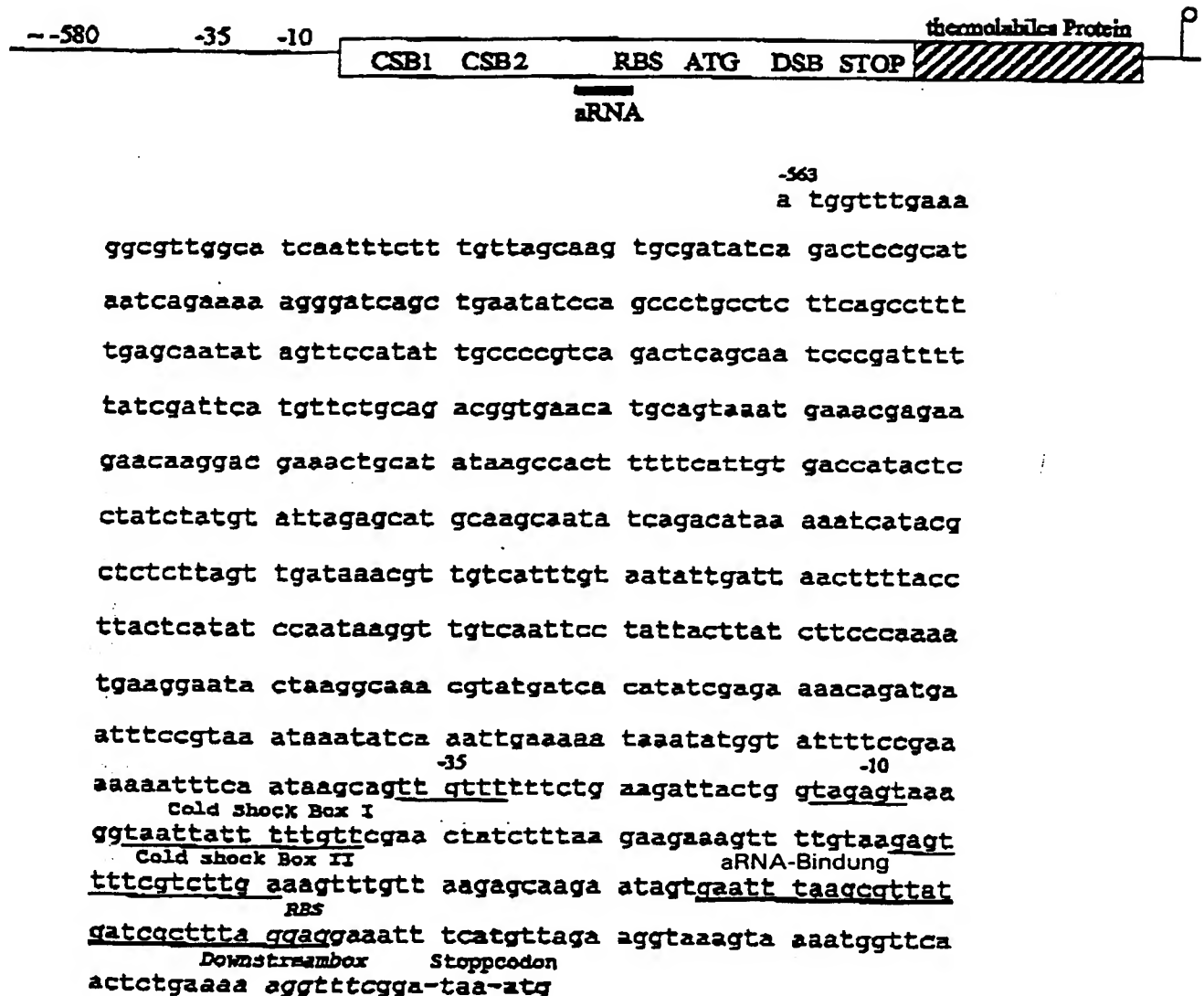


Abbildung 3

A λP_L - cII RBS-ctcctaaagcgatcataacgcttaaattcccc- Terminator

gama- Gen für Antisense RNA

B

Abbildung 4

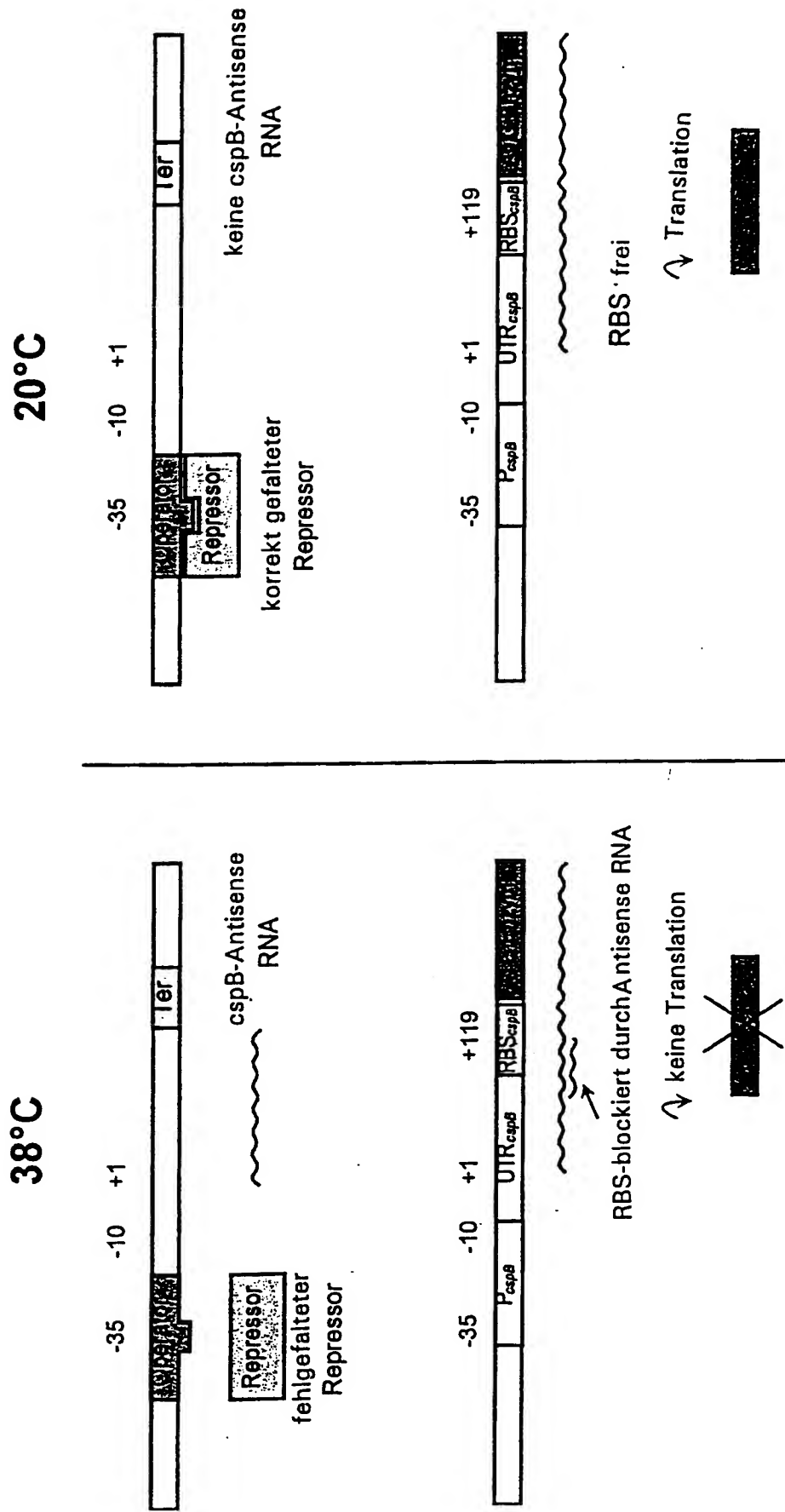
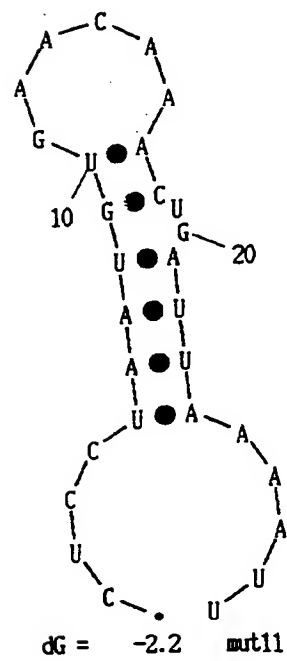
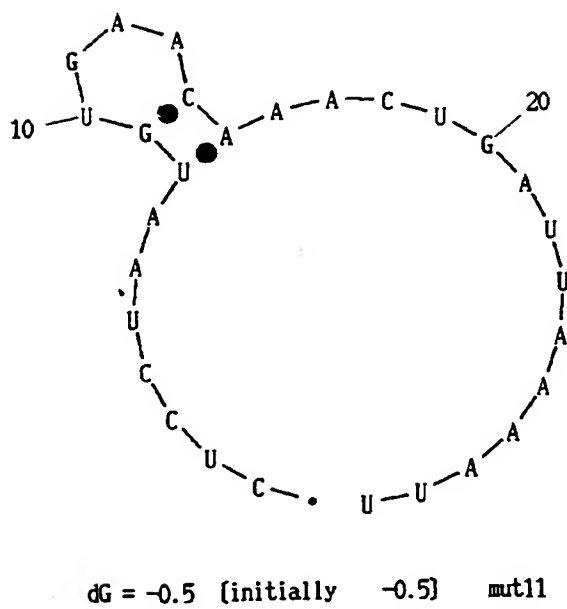
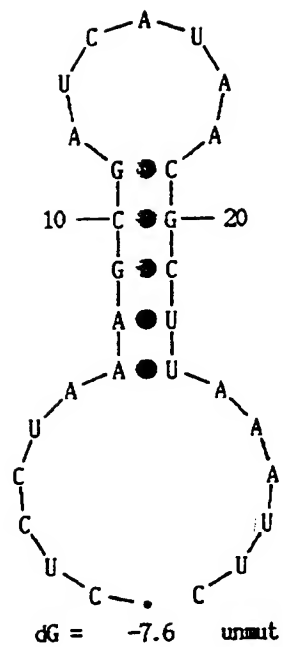
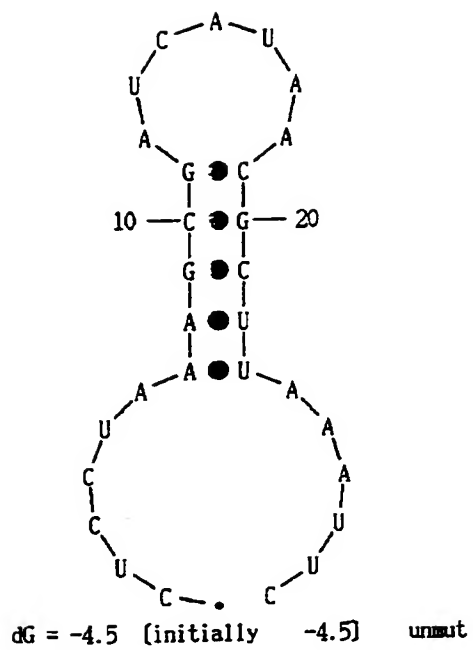


Abbildung 5



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
3. Mai 2001 (03.05.2001)

PCT

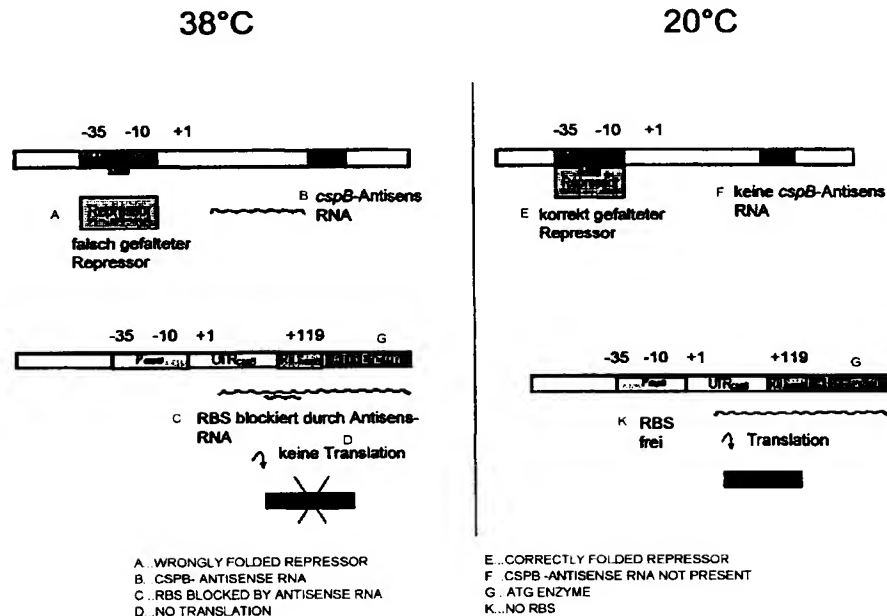
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/31040 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/75, 15/79, 1/21, C12P 21/00
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/10593
- (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 2000 (27.10.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch
- (30) Angaben zur Priorität: 199 51 765.7 27. Oktober 1999 (27.10.1999) DE
- (71) Anmelder und
(72) Erfinder: SCHWEDER, Thomas [DE/DE]; Steinstrasse 13/14, 17489 Greifswald (DE).
- (73) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KANN, Tanja [DE/DE]; Lange Reihe 27A, 17489 Greifswald (DE).
- (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, 81679 München (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): CA, JP, US.
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- Veröffentlicht:
— mit internationalem Recherchenbericht
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts: 8. November 2001

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: HOST-VECTOR SYSTEMS IN ORDER TO OVER-PRODUCE THERMOLABILE ENZYMES ORIGINATING FROM PSYCHROPHILIC ORGANISMS

(54) Bezeichnung: WIRTS-VEKTOR-SYSTEME ZUR ÜBERPRODUKTION VON THERMOLABILEN ENZYMEN PSYCHROPHILER ORGANISMEN



(57) Abstract: The invention relates to a system for temperature-regulated gene expression, in particular for the over-expression of cold-adapted, thermolabile proteins originating from psychrophilic organisms.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Systeme zur temperaturregulierten Genexpression, insbesondere zur Überexpression von kälteangepassten, thermolabilen Proteinen aus psychrophilen Organismen.

WO 01/31040 A3



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/10593

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/75 C12N15/79 C12N1/21 C12P21/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EP0-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 98 27220 A (UNIV NEW JERSEY MED) 25 June 1998 (1998-06-25) page 1, last paragraph -page 3, last paragraph page 9, paragraph 2 - paragraph 5 page 10, paragraph 2 examples 8,9	1,13,16
A	---	4,6-8
A	EP 0 691 406 A (BIO TECHNOLOGY GENERAL CORP) 10 January 1996 (1996-01-10) page 3, line 20 - line 50 page 9, line 9 - line 46	1,7,8, 10,13,17
A	WO 96 03521 A (YISSUM RES DEV CO) 8 February 1996 (1996-02-08) page 24, last paragraph -page 28, paragraph 3	1
	--- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

12 July 2001

Date of mailing of the international search report

24/07/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

De Kok, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/10593

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BENTLEY W E ET AL: "Antisense RNA for manipulating cellular stresses in E. coli." ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, vol. 213, no. 1-3, 1997, page BIOT 178 XP000926553 213th National Meeting of the American Chemical Society; San Francisco, California, USA; April 13-17, 1997 ISSN: 0065-7727 abstract -----	1
A	WO 92 19718 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 12 November 1992 (1992-11-12) page 8, line 3 -page 9, line 24 -----	1,7,8, 13,16,17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/10593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9827220 A	25-06-1998	US 5981280 A AU 5810498 A EP 0966541 A	09-11-1999 15-07-1998 29-12-1999
EP 0691406 A	10-01-1996	AT 66959 T AT 136934 T AU 615663 B AU 1977788 A AU 577298 B AU 3034584 A BG 49721 A BG 49718 A BR 8403523 A CA 1254527 A CZ 8405246 A DD 229427 A DD 240217 A DE 3485003 A DE 3486425 D DE 3486425 T DK 347184 A EP 0131843 A EP 0319049 A ES 534321 D ES 8602947 A ES 544976 D ES 8604252 A FI 842842 A, B, HK 128095 A HU 209878 B IE 64174 B IL 72396 A IL 91826 A IL 91828 A JP 1955462 C JP 6087780 B JP 60091986 A JP 9131190 A JP 2568376 B JP 7099990 A NZ 208897 A NZ 227962 A RO 91332 A SK 524684 A US 4997916 A US 5637495 A US 5670371 A US 5198361 A US 4871835 A US 4831120 A US 5256546 A US 6054291 A ZA 8405345 A	15-09-1991 15-05-1996 10-10-1991 22-12-1988 22-09-1988 17-01-1985 15-01-1992 15-01-1992 25-06-1985 23-05-1989 16-07-1997 06-11-1985 22-10-1986 10-10-1991 23-05-1996 17-10-1996 16-01-1985 23-01-1985 07-06-1989 01-12-1985 16-03-1986 16-01-1986 01-06-1986 16-01-1985 18-08-1995 28-11-1994 12-07-1995 25-05-1992 25-05-1992 25-05-1992 28-07-1995 09-11-1994 23-05-1985 20-05-1997 08-01-1997 18-04-1995 26-06-1990 26-06-1990 30-04-1987 08-10-1997 05-03-1991 10-06-1997 23-09-1997 30-03-1993 03-10-1989 16-05-1989 26-10-1993 25-04-2000 27-03-1985
WO 9603521 A	08-02-1996	US 5654169 A US 5726039 A AU 3131195 A EP 0772691 A	05-08-1997 10-03-1998 22-02-1996 14-05-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national Application No

PCT/EP 00/10593

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9603521 A		JP 10503090 T	24-03-1998
WO 9219718 A	12-11-1992	AU 1914892 A	21-12-1992

PCT/EP 00/10593

IPK 7 C12N15/75 C12N15/79 C12N1/21 C12P21/00

IPK 7 C12N

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, SCISEARCH, BIOTECHNOLOGY ABS, CHEM ABS Data

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts
12. Juli 2001	24/07/2001
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter De Kok, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BENTLEY W E ET AL: "Antisense RNA for manipulating cellular stresses in E. coli." ABSTRACTS OF PAPERS AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, Bd. 213, Nr. 1-3, 1997, Seite BIOT 178 XP000926553 213th National Meeting of the American Chemical Society; San Francisco, California, USA; April 13-17, 1997 ISSN: 0065-7727 Zusammenfassung ----	1
A	WO 92 19718 A (SMITHKLINE BEECHAM CORP) 12. November 1992 (1992-11-12) Seite 8, Zeile 3 -Seite 9, Zeile 24 -----	1,7,8, 13,16,17

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10593

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9827220	A	25-06-1998	US	5981280 A	09-11-1999
			AU	5810498 A	15-07-1998
			EP	0966541 A	29-12-1999
<hr/>					
EP 0691406	A	10-01-1996	AT	66959 T	15-09-1991
			AT	136934 T	15-05-1996
			AU	615663 B	10-10-1991
			AU	1977788 A	22-12-1988
			AU	577298 B	22-09-1988
			AU	3034584 A	17-01-1985
			BG	49721 A	15-01-1992
			BG	49718 A	15-01-1992
			BR	8403523 A	25-06-1985
			CA	1254527 A	23-05-1989
			CZ	8405246 A	16-07-1997
			DD	229427 A	06-11-1985
			DD	240217 A	22-10-1986
			DE	3485003 A	10-10-1991
			DE	3486425 D	23-05-1996
			DE	3486425 T	17-10-1996
			DK	347184 A	16-01-1985
			EP	0131843 A	23-01-1985
			EP	0319049 A	07-06-1989
			ES	534321 D	01-12-1985
			ES	8602947 A	16-03-1986
			ES	544976 D	16-01-1986
			ES	8604252 A	01-06-1986
			FI	842842 A, B,	16-01-1985
			HK	128095 A	18-08-1995
			HU	209878 B	28-11-1994
			IE	64174 B	12-07-1995
			IL	72396 A	25-05-1992
			IL	91826 A	25-05-1992
			IL	91828 A	25-05-1992
			JP	1955462 C	28-07-1995
			JP	6087780 B	09-11-1994
			JP	60091986 A	23-05-1985
			JP	9131190 A	20-05-1997
			JP	2568376 B	08-01-1997
			JP	7099990 A	18-04-1995
			NZ	208897 A	26-06-1990
			NZ	227962 A	26-06-1990
			RO	91332 A	30-04-1987
			SK	524684 A	08-10-1997
			US	4997916 A	05-03-1991
			US	5637495 A	10-06-1997
			US	5670371 A	23-09-1997
			US	5198361 A	30-03-1993
			US	4871835 A	03-10-1989
			US	4831120 A	16-05-1989
			US	5256546 A	26-10-1993
			US	6054291 A	25-04-2000
			ZA	8405345 A	27-03-1985
<hr/>					
WO 9603521	A	08-02-1996	US	5654169 A	05-08-1997
			US	5726039 A	10-03-1998
			AU	3131195 A	22-02-1996
			EP	0772691 A	14-05-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/10593

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9603521 A		JP 10503090 T	24-03-1998
WO 9219718 A	12-11-1992	AU 1914892 A	21-12-1992